



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Agrárias
Curso de Graduação em Agronomia



Diversidade Genética de Espécies de Bambu
na Ilha de Santa Catarina: Observações Preliminares

Julia Zappellini

Florianópolis – SC

2014

Julia Zappelini

**Diversidade Genética de Espécies de Bambu
na Ilha de Santa Catarina: Observações Preliminares**

Relatório de Estágio Obrigatório
apresentado ao curso de Graduação
em Agronomia, do Centro de Ciências
Agrárias, da Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito parcial
para a obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Prof. Dra. Rosete
Pescador

Supervisora: Márcia Denise
Rossarolla

Local: Laboratório de Fisiologia do
Desenvolvimento e Genética Vegetal
– CCA/UFSC.

Florianópolis – SC
2014

Julia Zappellini

**Diversidade Genética de Espécies de Bambu
na Ilha de Santa Catarina: Observações Preliminares**

Relatório de Estágio Obrigatório aprovado
pela comissão examinadora em:

Comissão examinadora

Prof. Dra. Rosete Pescador
Orientadora – FIT/CCA/UFSC

Msc. Thiago M. Greco
Examinador – FIT/CCA/UFSC

Eng. Agr. Márcia Denise Rossarolla
Examinadora – PPGRGV/CCA/UFSC

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Aldo e Norma, pelo amor e por sempre acreditarem em mim; por me ensinarem a sempre confiar nas pessoas e a fazer o bem.

As minhas irmãs, Ana e Ale, pelo apoio incondicional e cumplicidade.

Ao Gui, meu companheiro, melhor amigo, pelos momentos inesquecíveis, por estar sempre presente e pelo amor.

Ao Jorginho, que por mais que seja um felino, é um grande amigo e confidente.

Aos meus amigos, por serem fonte de inspiração e de alegria sempre.

A Professora Rosete, por ter confiança no meu trabalho e por sempre estar disposta a dar apoio e oportunidades.

A Marcia e ao Thiago, por estarmos juntos nessa empreitada, subindo e descendo morros à procura de bambus, e por aceitarem fazer parte desta banca.

Aos amigos do laboratório, pelo convívio diário, pelas risadas e por sempre estares dispostos a ensinar, ajudar e a tomar um mate.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para que este trabalho pudesse ser feito com alegria e sucesso.

Agradeço de coração.

Diversidade Genética de Espécies de Bambu

na Ilha de Santa Catarina: Observações Preliminares

Resumo: O estágio foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal – UFSC, sob supervisão e orientação da Prof^a. Dr^a. Rosete Pescador, através do projeto “Tecnologias para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do bambu no sul do Brasil – Chamada MCTI/Ação Transversal/CNPq nº 66/2013”. Bambus formam um dos grupos de importância de gramíneas perenes, família Poaceae, subfamília Bambusoideae. São frequentemente chamados de “ouro verde da floresta” devido às suas múltiplas utilidades. A ilha de Santa Catarina vem sofrendo intensa urbanização e destruição de habitats naturais. Com a necessidade de conservação e conhecimento para o manejo dos recursos de bambus no país, informações de taxonomia e de diversidade genética de espécies elencadas no projeto em questão são de grande importância. Foram realizadas expedições a campo para a localização de populações de diferentes espécies de bambu, bem como a coleta de material vegetal destas para posteriores estudos de diversidade genética de população e *barcode*. Além disso, foram realizados testes de extração de DNA da espécie *Chusquea tenella* utilizando os seguintes protocolos: kit comercial de extração NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel) e método Doyle & Doyle com CTAB 2%. Observou-se que a extração com o método CTAB 2% foi mais eficiente em relação à quantidade extraída de DNA, porém, com baixa qualidade. O DNA extraído com o kit comercial foi em menor quantidade, mas em melhor qualidade. No entanto, novos testes são necessários para o aperfeiçoamento dos métodos de extração para a otimização dos estudos com marcadores moleculares.

Palavras-chave: Bambusoideae, *Chusquea tenella*, Conservação, Florianópolis.

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1 Objetivos Gerais.....	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. Atividades realizadas	4
3.1 Revisão Bibliográfica	4
3.1.1 Descrição da subfamília Bambusoideae	4
3.1.2 Usos dos bambus.....	6
3.1.3 Taxonomia e classificação	7
3.1.4 Marcadores Moleculares – Microssatélites.....	8
3.2 Material e Métodos.....	9
3.2.1 Material vegetal coletado.....	9
3.2.2 Local e datas das coletas do material vegetal.....	9
3.2.3 Teste de protocolo de extração de DNA.....	10
3.2.3.1 Maceração das amostras	11
3.2.3.2 Protocolos utilizados para a extração de DNA genômico total:	11
3.2.3.3 Quantificação e verificação da qualidade do DNA	14
3.3 Resultados e Discussão	16
3.3.1 Autorização para a coleta de material biológico – Sisbio	16
3.3.2 Coleta de material vegetal.....	19
3.3.3 Teste de protocolo de extração de DNA pra <i>Chusquea tenella</i>	23
3.4 Conclusões e perspectivas.....	25
4. Considerações Finais	26
5. Referências.....	27

1. Introdução

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas durante a disciplina de Estágio Curricular Obrigatório, do curso de Agronomia, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O estágio foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), no Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFSC), durante o período de 18 de agosto a 07 de novembro de 2014, totalizando 360 horas. A orientação e supervisão do estágio foi da Prof^a. Dr^a. Rosete Pescador, professora pesquisadora da Universidade Federal de Santa Catarina. Durante o estágio, foram realizados estudos com espécies de bambus presentes na Ilha de Santa Catarina, de acordo com o projeto “Tecnologias para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do bambu no sul do Brasil – Chamada MCTI/Ação Transversal/CNPq nº 66/2013”.

As espécies de bambus formam um dos grupos de importância de gramíneas perenes, família Poaceae, subfamília Bambusoideae. São frequentemente chamados de “ouro verde da floresta” devido às suas múltiplas utilidades. Os bambus estão naturalmente distribuídos entre as regiões tropical e subtropical do globo, sendo comumente encontrados na África, Ásia e Américas, abrangendo desde climas frios de regiões montanhosas a climas quentes e úmidos de florestas tropicais. A população total de espécies de bambus no mundo é representada por 118 gêneros e cerca de 1.400 espécies (Judziewicz & Clark, 2007). A Ásia é o centro mundial de diversidade de bambus, contribuindo com 65% das espécies, onde somente a Índia e a China contribuem com aproximadamente 45% do total de recursos genéticos de bambu do mundo (Judziewicz *et al.*, 1999). Nas Américas estão descritos 451 espécies de bambus pertencentes a 41 gêneros, distribuídos desde o sudeste dos Estados Unidos da América até o sul do Chile (Londoño, 2001). Na América do Sul, os países com maior diversidade natural são o Brasil, a Venezuela e a Colômbia (Judziewicz *et al.*, 1999).

A classificação de espécies de bambus é difícil devido ao seu ciclo de vida particular. Caracteres vegetativos são usados para o reconhecimento e classificação de espécies de bambus, uma vez que em muitas espécies o florescimento é raro, chegando a apresentar intervalos de 120 anos ou mais

(Friar & Kochert, 1991). Há evidências de que algumas espécies nunca apresentaram floração (Friar & Kochert, 1991; Janzen, 1976). A maior dificuldade de relacionar classificação de espécies com floração é que, muitas vezes, estes caracteres são influenciados por fatores ambientais e regulados por poucos genes (Wu, 1962).

O bambu apresenta características comercialmente importantes, como a facilidade de reprodução assexuada, curta rotação, alta longevidade e alta produtividade. Razões estas que tem levado o bambu a ser intensamente usado para a obtenção de biomassa para a extração de celulose de fibras longas para fabricação de papel de alta resistência. No Brasil, a maior produção é obtida no Nordeste, em particular nos Estados de Pernambuco, Paraíba e Maranhão, onde estão os maiores plantios mundiais, usando *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex J.C. Wendl. Em geral, outros países exploram basicamente populações naturais (Bonilla, 1991).

A ilha de Santa Catarina vem sofrendo um contínuo e acelerado processo de urbanização nas últimas décadas, que exerce grandes pressões sobre as áreas naturais e consequentemente reduzindo os habitats das espécies nativas (Greco, 2013). Com a necessidade de conservação e manejo dos recursos de bambu, algumas informações prévias de diversidade genética de populações a serem conservadas e exploradas são imprescindíveis. Neste sentido, a genética molecular pode proporcionar um acesso rápido a essas informações.

Em virtude da problemática descrita, objetivou-se realizar estudos prévios com ênfase em genética de populações de espécies de bambus elencadas no projeto de pesquisa em questão.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Realizar um estudo de genética de populações de espécies-alvo do projeto de pesquisa “Tecnologias para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do bambu no sul do Brasil – Chamada MCTI/Ação Transversal/CNPq nº 66/2013” presentes na região da ilha de Santa Catarina.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar expedições a campo para a identificação e localização de espécies-alvo do projeto em questão;
- Coletar material vegetal que será posteriormente empregado em estudos de diversidade genética entre e dentro de populações;
- Testar diferentes protocolos de extração de DNA em *Chusquea tenella*, uma das espécies-alvo do projeto “Tecnologias para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do bambu no sul do Brasil – Chamada MCTI/Ação Transversal/CNPq nº 66/2013”.

3. Atividades realizadas

Durante o estágio foram realizadas atividades relacionadas à coleta de material vegetal, sendo estes de espécies-alvo do projeto “Tecnologias para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do bambu no sul do Brasil – Chamada MCTI/Ação Transversal/CNPq nº 66/2013” e teste de protocolos de extração de DNA para *Chusquea tenella* Ness. O material vegetal coletado será posteriormente utilizado em dois estudos distintos, de diversidade genética entre e dentro de populações e a realização de um estudo de *barcode* das espécies.

O estágio foi realizado em três etapas: 1) Realização das coletas de material vegetal na região da ilha de Florianópolis; 2) Realização de teste de protocolos de extração de DNA para uma das espécies coletadas e; por fim, 3) Antes e após as atividades anteriores, foi realizado o levantamento bibliográfico para a construção do conteúdo científico do estudo. Assim, segue adiante a revisão bibliográfica, bem como as etapas de material e métodos, resultados e discussão e considerações finais.

3.1 Revisão Bibliográfica

3.1.1 Descrição da subfamília Bambusoideae

Entre as Angiospermas, a família Poaceae, popularmente denominadas de gramíneas, ocupa a maior diversidade de habitats e possuem o maior número de representantes espalhados pelo planeta Terra (Soderström & Caldéron, 1974). As gramíneas herbáceas, chamadas de *gramas* ou *grasses* são responsáveis pela ocupação de cerca de 30% da área total do planeta (Chapman, 1990). Outro importante grupo é o das gramíneas “bambusóides”, pertencentes à subfamília Bambusoideae.

Os bambus formam o grupo das maiores gramíneas do mundo. São plantas perenes, com crescimento monopodial ou simpodial, com rizomas bem desenvolvidos, possuindo caules aéreos do tipo colmos sólidos ou ocos (Judziewicz *et al.*, 1999), lâminas pseudopecioladas, relativamente amplas, mesófilo com células braciformes com invaginações assimétricas e células

fusóides bem desenvolvidas, rota fotossintética C3 e ausência de anatomia Kranz (Bamboo Phylogeny Group - BPG, 2012), desenvolvendo-se naturalmente em regiões de clima subtropical e tropical. São encontrados geralmente em habitats mais úmidos e sombreados, associados a plantas lenhosas (Soderström & Caldéron, 1974).

A subfamília Bambusoideae, com cerca de 1.400 espécies descritas em 118 gêneros, única linhagem da família Poaceae com grande diversificação em habitat florestal (Judziewicz & Clark, 2007), é classificada em três grandes grupos conhecidos como tribos. São elas: a) os bambus lenhosos tropicais, compondo a tribo Bambuseae, com 784 espécies distribuídas por todo o mundo, sendo que na Europa ocorrem somente espécies introduzidas; b) os bambus lenhosos temperados, formando a tribo Arundinarieae, com 533 espécies com distribuição principalmente no hemisfério Norte Temperado e Ásia; por fim c) os bambus herbáceos, componentes da tribo Olyreae, com 122 espécies, grande parte restritas às Américas (Sungkaew *et al.*, 2009).

A tribo Olyreae, bambus herbáceos, está distribuída nas florestas tropicais e subtropicais do planeta, não alcançando regiões temperadas ou altitudes acima de 1000 m (Zhang & Clark, 2000). O Brasil possui a área com maior diversidade desta tribo, com 16 gêneros e 90 espécies (Filgueiras *et al.*, 2011). São plantas pequenas, cespitosas, formadoras de touceiras, não lignificados, com ramificação vegetativa limitada, floração sazonal e espiguetas unissexuais (Judziewicz *et al.*, 1999). Ao contrário dos bambus lenhosos, tem a sua origem provada por estudos moleculares, sem nenhuma característica morfológica exclusiva que tenha sido identificada para essa tribo (BPG, 2012).

Os bambus lenhosos apresentam uma única origem com base em características morfológicas bem distinguidas, como a ramificação complexa, presença de folhas do colmo, folhas modificadas com a finalidade de proteção de brotos novos e tenros, e lígulas externas nas folhas do ramo, bem como flores bissexuadas. No entanto, dados moleculares segregam estes bambus em duas tribos, Bambuseae e Arundinarieae (BPG, 2012). Nas Américas, os bambus lenhosos pertencem principalmente à tribo Bambuseae, uma vez que Arundinarieae apresenta somente três espécies nativas pertencentes ao gênero *Arundinaria* Michx, endêmicas dos Estados Unidos (Triplett & Clark, 2010).

Os bambus lenhosos estão entre os mais úteis produtos das florestas tropicais (Ramanayake *et al.*, 2007). São amplamente utilizadas como matéria-prima no artesanato, construções e indústria, como substituto da madeira, e na alimentação. Atualmente, os colmos dos bambus são considerados a única alternativa sustentável de material de construção, e extensivamente usado na fabricação de estruturas. Os bambus são considerados uma boa alternativa de materiais de construção, uma vez que eles contribuem para a oxigenação do ambiente e fixação de dióxido de carbono (Correal & Arbeláez, 2010).

Dentre os principais centros mundiais de diversidade de bambu, está a Mata Atlântica Brasileira, que se estende desde o estado da Paraíba ao Rio Grande do Sul, em uma estreita faixa costeira, caracterizando-se principalmente por períodos de chuvas abundantes (Moris *et al.*, 1983). Os estados brasileiros de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia e Santa Catarina são os que possuem a maior diversidade de bambus lenhosos (BPG, 2012). Assim, é possível afirmar que a região da Mata Atlântica Brasileira é fundamental para manter a diversidade genética de bambus, servindo ainda como fonte de alimento e moradia para espécies animais silvestres (Bystriakova *et al.*, 2003).

3.1.2 Usos dos bambus

Os bambus são classificados como um dos recursos naturais renováveis mais importantes no desenvolvimento da humanidade (Negi & Saxena, 2011). Atualmente, é uma das plantas responsáveis pela redução da pobreza em diversas partes do mundo (Singh *et al.*, 2013), servindo como material de construção de baixo custo, recuperação de áreas degradadas, planta forrageira, fonte de fibras para a indústria do papel e celulose e matéria-prima para artesãos. Além destas características, por serem plantas de crescimento rápido, possuem grande potencial como fonte de biomassa (Sharma & Sarma, 2011).

O colmo é a parte do bambu mais interessante, do ponto de vista agrônomo (Silva, 2005), pois possui características físicas e tecnológicas que o tornam uma alternativa sustentável para a o uso da madeira (Sharma & Sarma, 2011). Na recuperação de áreas degradadas, atuam como

estabilizadores nos efeitos de erosão do solo, devido a sua estrutura rizomatosa, podendo diminuir a erosão em até 75% (Barbosa, 2012).

No entanto, além da fragmentação dos ecossistemas, a imensa utilidade e versatilidade deste recurso natural tem resultado na sua incontável extração e exploração, levando ao iminente declínio das populações naturais. Assim, há a necessidade de conservação de germoplasma, tanto *in vivo* como *in vitro* (Singh *et al.*, 2013). Para a conservação e correta utilização dos recursos genéticos do bambu, faz-se necessário o conhecimento detalhado de genótipos e diversidade genética entre espécies e populações (Nirmala *et al.*, 2012).

3.1.3 Taxonomia e classificação

A taxonomia e classificação dos bambus são feitas a partir de características morfológicas, como folhas, ramos, nós e entrenós, colmos e inflorescências (Triplett *et al.*, 2010). Porém, alguns estudos mostram que os bambus podem levar cerca de 120 anos para entrarem em floração (Friar & Kochet, 1991), enquanto que outros estudos mostram que algumas espécies nunca floresceram (Janzen, 1976). Alguns autores, como Watson & Dallwitz (1992), afirmam que a descrição das espécies de bambus não será possível até que a morfologia das inflorescências e espiguetas seja padronizada.

As revisões taxonômicas de determinados grupos de bambus são de grande interesse para a pesquisa, uma vez que, a partir destes estudos, são delimitados os táxons, mapeadas as suas distribuições geográficas, determinado o nível de conservação, e assim, pode-se avançar nos estudos de conservação das espécies (Filgueiras & Santos-Gonçalves, 2011).

Embora as características morfológicas tenham sido utilizadas para caracterizar níveis e padrões de diversidade, estas características sozinhas refletem apenas uma pequena porção do genoma das plantas (Nirmala *et al.*, 2012). Portanto, são limitantes na descrição da potencial complexidade na estrutura genética existente dentro e entre os táxons. Assim, marcadores moleculares podem facilitar a aquisição de informações e resultados mais confiáveis para analisar diversidade genética das espécies.

3.1.4 Marcadores Moleculares – Microssatélites

Nos últimos anos, houve um aumento significativo de metodologia da genética molecular e suas aplicações para resolver problemas e aumentar a eficiência dos programas de conservação e uso de recursos genéticos vegetais. Assim, com o advento de tecnologias em Biologia Molecular, surgiram, por exemplo, diversos tipos de marcadores moleculares que detectam o polimorfismo genético diretamente no DNA. O “Dogma Central da Biologia Molecular” é o princípio da utilização destes marcadores, que pressupõe que diferenças genéticas do DNA significam diferenças genotípicas (Faleiro, 2007).

A tecnologia dos marcadores moleculares tem continuamente evoluído desde hibridização baseada em RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) à PCR (*Polymerase Chain Reaction*), baseada em RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) and SSR (*Simple Sequence Repeats*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) de alto rendimento e, mais recentemente, Genotipagem por Sequenciamento (GBS) foi estabelecida (Mir *et al*, 2013). Progressos consideráveis foram atingidos em bambus, utilizando-se dos marcadores moleculares, abrangendo a identificação de espécies, estudos de diversidade genética e genética de populações, testes de fidelidade clonal e o estabelecimento de relações filogenéticas (BPG, 2012).

O genoma de eucariotos possui sequências repetidas que podem servir como marcadores moleculares, chamadas de Sequências Simples Repetidas – SSR, ou STMS (“*Sequence Tagged Microsatellite Site*”) ou Microssatélites. Estes são considerados um dos marcadores mais polimórficos encontrado hoje nos genomas animais e vegetais. São marcadores caracterizados por pequenas sequências, de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, que pode estar repetidas em *tandem*, ou seja, uma após a outra. Estas sequências conservadas têm sido usadas para desenhar os *primers* que serão utilizados em PCR, e posteriormente revelados em géis de agarose. Estes *primers* usados pra amplificar os loci microssatélites em particular poderão revelar polimorfismos, causando a diferença de tamanho no produto da amplificação, e cada comprimento diferente representa um alelo no locus. O polimorfismo pode

ser atribuído à mudança no número de repetições no locus em questão, possivelmente causado devido a alterações durante o processo de replicação do DNA (Gupta *et al.*, 1996).

Os microssatélites são marcadores vantajosos, quando comparados a outros tipos de marcadores, por serem altamente polimórficos e informativos, apresentarem herança codominante (o que permite a diferenciação dos loci em homozigose dos loci em heterozigose), serem multialélicos e de grande ocorrência e dispersão nos genomas das espécies, serem baseados em PCR (necessitando de uma pequena quantidade de DNA), serem altamente reproduzíveis e não requererem radioatividade (Salles *et al.*, 2003). No entanto, apresenta desvantagens pelo alto custo requerido para o desenvolvimento dos primers específicos, quando eles não estão disponíveis para a espécie estudada, e pelo fato de bandas inespecíficas ou géis de baixa resolução poderem dificultar a acurada avaliação dos polimorfismos (Faleiro *et al.*, 2004)

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material vegetal coletado

As espécies coletadas estão dentro das espécies selecionadas para o projeto “Tecnologias para o desenvolvimento sustentável para a cadeia produtiva do bambu no sul do Brasil – Chamada MCTI/Ação Transversal/CNPq N.º 66/2013” (Tabela 1).

3.2.2 Local e datas das coletas do material vegetal

Foi feita a solicitação de autorização para coleta de material biológico e para a realização de pesquisa em unidades de conservação federal. O documento é fornecido pelo Sisbio (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade), vinculado ao ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), que por sua vez é vinculado ao MMA (Ministério do Meio Ambiente).

As coletas foram realizadas em diferentes localidades da Ilha de Santa Catarina, em diferentes datas (Tabela 2). A Ilha de Santa Catarina situa-se no Oceano Atlântico, litoral do sul do Brasil, entre as coordenadas geográficas 27°22' e 27°51' latitude sul e 48°20' e 48°37' longitude oeste, e compreende cerca de 54 km de comprimento (norte-sul) e 18 km de largura (leste-oeste), totalizando cerca de 420 km². Possui topografia diversa, variando desde o nível do mar até morros com 532 m de altitude. A vegetação é constituída predominantemente por formações do domínio Mata Atlântica, incluindo Floresta Ombrófila Densa e associação de ecossistemas de manguezais, vegetação de restinga, praias, dunas e florestas de planícies quaternárias (Horn Filho, 2004). A figura 1 mostra ilustrações das espécies coletadas.

Considera-se uma população apta a ser coletada aquela que contém no mínimo 50 indivíduos. Contudo, coletaram-se também as espécies onde não se obteve acesso a 50 indivíduos, com a finalidade de um posterior estudo de *barcode* das mesmas. As populações coletadas serão utilizadas posteriormente para o estudo de diversidade genética dentro e entre as populações.

Coletou-se cerca de 200g de folha dos indivíduos, que foram armazenadas em sacos de plástico e congeladas em *freezer* -20°C. Foram coletados ramos, folhas e estruturas especializadas para a montagem de exsiccatas seguindo a metodologia proposta por Soderström & Young (2003). Para o posterior teste de protocolo de extração de DNA, foram coletadas folhas de *Chusquea tenella* (Figura 2).

As coordenadas geográficas dos locais de coleta, bem como dos indivíduos coletados, foram registradas em GPS topográfico Garmin® Oregon 550t, as quais foram posteriormente exportados para o software GPS TrackMaker®, para a elaboração de um mapa da Ilha de Santa Catarina com a ocorrência das coletas realizadas.

3.2.3 Teste de protocolo de extração de DNA

Foram testados dois tipos de protocolos de extração de DNA, visando obter a melhor qualidade de DNA extraído para aperfeiçoar o desempenho dos futuros marcadores moleculares. O teste ocorreu no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal/CCA/UFSC.

3.2.3.1 Maceração das amostras

Foram utilizadas cerca de 200 mg de amostras de folhas congeladas de *Chusquea tenella*, coletadas em 30 de outubro de 2014 no bairro João Paulo, de 4 indivíduos diferentes, enumerados de 1 a 4. As folhas foram maceradas com auxílio de almofariz e pistilo de porcelana em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino.

3.2.3.2 Protocolos utilizados para a extração de DNA genômico total:

- Protocolo CTAB 2% com modificações (Doyle & Doyle, 1987):

O tampão de extração é composto por 1 mL de CTAB 2% (2% de brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB; 1,4 M de NaCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM de EDTA, pH 8,0;) por g de amostra e 2 µL β-mercaptoetanol por mL de CTAB 2%. Adicionou-se 1 mL de solução de extração ao material macerado, formando uma “pasta”, transferindo esta para um microtubo de 2 mL. Agitaram-se os tubos manualmente e estes foram incubados em banho-maria a 65°C por 50 minutos, homogeneizando-os suavemente a cada 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v:v), agitando os tubos suavemente até a formação de uma emulsão. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10000 rpm, e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo (1,5 mL), onde foram adicionado 400 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram acondicionados em freezer por 1h (mínimo) e, após, novamente centrifugados por 8 minutos a 12000 rpm, para a precipitação do DNA. Descartou-se o sobrenadante e fez-se a lavagem do *pellet* de DNA uma vez com etanol 70% por 3 minutos, e mais uma vez com etanol 100% por 3 minutos. Os tubos foram invertidos em papel toalha, para a secagem do etanol, em capela de exaustão. Após, o DNA foi ressuscitado em 100 µL de TE e RNase, e posteriormente armazenados a -20°C.

Tabela 1. Espécies de bambus selecionadas para o projeto “Tecnologias para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do bambu no sul do Brasil.”

Nome botânico	Nome comum	Alt. x Diâm (máx.)	Origem	Principais usos
<i>Dendrocalamus asper</i> (Schult & Schult f.) Baker ex K. Heyne	Bambu-balde	30 m x 20 cm	Malásia	Construção, Laminados, Brotos
<i>Dendrocalamus giganteus</i> Wall. ex Munro	Bambu-gigante	35 m x 25 cm	Tailândia	Construção, Laminados, Brotos
<i>Dendrocalamus latiflorus</i> Munro	Gigante de Taiwan	25 m x 18 cm	China, Taiwan	Brotos
<i>Guadua angustifolia</i> Kunth	Guadua	25 m x 20 cm	Colômbia, Equador	Construção, Laminados
<i>Guadua magna</i> Londoño & Filgueiras	Taquaraçu	25 m x 13 cm	Brasil	Construção, Laminados
<i>Guadua chacoensis</i> (Rojas) Londoño & P.M. Peterson	Taquaraçu	20 m x 18 cm	Brasil, Paraguai	Construção, Laminados
<i>Guadua paraguayana</i> Döll	Picana, Picanilla	10 m x 5 cm	Brasil, Paraguai, Argentina	Movelaria
<i>Guadua superba</i> Huber	Taboca	20 m x 15 cm	Brasil	Construção, Laminados, Movelaria
<i>Guadua tagoara</i> (Nees) Kunth	Taquaraçu	20 m x 10 cm	Brasil	Construção, Laminados, Movelaria
<i>Guadua weberbaueri</i> Pilger	Taboaca	20 m x 10 cm	Brasil	Construção, Laminados, Movelaria
<i>Drepanostachyum falcatum</i> (Nees) Keng f.	Bambu de Jardim	4 m x 1,5 cm	China, Japão	Ornamental
<i>Bambusa oldhamii</i> Munro	Oldhamii	15 m x 8 cm	China	Movelaria, Brotos
<i>Merostachys speciosa</i> Spreng	Taquara póca	15 m x 3 cm	Brasil	Artesanato indígena
<i>Merostachys multiramea</i> Hackel.	Taquara	12 m x 4 cm	Brasil	Artesanato indígena
<i>Merostachys skvortzovii</i> Send.	Taquara lixa	6 m x 3 cm	Brasil	Artesanato indígena
<i>Phyllostachys bambusoides</i> Siebold & Zucc.	Madake	0 m x 15 cm	China	Movelaria, Laminados
<i>Phyllostachys edulis</i> (Carrière) J. Houz.	Mossô	20 m x 20 cm	China	Construção, Laminados, Movelaria
<i>Phyllostachys aurea</i> Carrière ex Rivière & C. Rivière	Cana da Índia	8 m x 5 cm	China	Brotos, Movelaria

Tabela 2. Datas e localidades referentes às coletas de material vegetal de bambus em Florianópolis, SC.

Local	Data	Espécie	Quantidade*	Coordenadas geográficas
Parque da Joaquina;	12.09.2014	<i>M. scandens</i>	25	27°39'16''S ; 48°28'19''O
Campeche (atrás do posto policial)*	25.09.2014	<i>M. scandens</i>	7*	27°41'40''S ; 48°30'25''O
Campeche (Cond. Engenho)*	25.09.2014	<i>M. scandens</i>	18*	27°41'35''S ; 48°30'25''O
Faz. Exp. Ressacada (UFSC)	30.09.2014	<i>G. angustifolia</i>	2	27°41'40''S ; 48°30'25''O
		<i>G. chacoensis</i>	1	
		<i>B. tuldoideis</i>	1	
		<i>D. asper</i>	2	
		<i>B. multiplex</i>	2	
		<i>P. edulis</i>	1	
		<i>P. aurea</i>	1	
		<i>B. vulgaris</i>	1	
		<i>B. oldhamii</i>	1	
Praia Mole*	01.10.2014	<i>C. tenella</i>	15*	27°35'55''S ; 48°25'53''O
Praia Mole*	02.10.2014	<i>C. tenella</i>	39*	27°35'55''S ; 48°25'53''O
Praia dos Ingleses*	15.10.2014	<i>C. tenella</i>	20*	27°26'38''S ; 48°22'07''O
Praia dos Ingleses*	16.10.2014	<i>C. tenella</i>	33*	27°26'38''S ; 48°22'07''O
João Paulo (Ponta do Goulart)	29.10.2014	<i>C. tenella</i>	53	27°33'41''S ; 48°31'22''O

* Número de indivíduos coletados. As populações das localidades Campeche, Praia Mole e Praia dos Ingleses são consideradas uma população, cada uma, mesmo que as coletas destas tenham sido feitas em dias diferentes.

- Protocolo extração com kit comercial:

Foi utilizado o kit comercial de extração NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel). Adicionou-se 400 µL de tampão PL1 a um microtubo de 2 mL contendo o material vegetal macerado. Neste mesmo microtubo, foram adicionados 10 µL de solução RNase A, misturando a amostra cuidadosamente e incubando o tubo em banho-maria 65°C por 10 minutos. Um novo microtubo (2 mL) contendo uma coluna de filtração lilás, para onde foi transferido o lisado, centrifugando 11000 rpm por 2 minutos. Foram adicionados 450 µL de tampão PC, e após, foi descartado a coluna de filtração. Em um novo microtubo (2 mL) com uma nova coluna de filtração verde, foram transferidos 700 µL da amostra e foi centrifugado por 1 minuto a 11000 rpm, descartando o sobrenadante. Foram adicionados 400 µL do tampão PW1 na coluna de filtração verde que, posteriormente, foi centrifugada a 11000 rpm por 1 minuto, e descartando o sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 500 µL do tampão PW2, que também foi centrifugado a 11000 rpm por 1 minuto, descartando o

sobrenadante. Outros 400 μL do mesmo tampão foram adicionados, centrifugando a solução a 11000 rpm por 2 minutos para remoção do tampão de lavagem e secagem total da membrana de sílica. A coluna de filtração verde foi transferida para um novo microtubo (1,5 mL), que estava mantido em estufa a 65°C. Foram adicionados 50 μL do tampão PE, também aquecido. Estes tubos foram incubados em estufa por 5 minutos a 65°C e, após foi feita a centrifugação à 11000 g por 1 minuto, para a eluição do DNA. Armazenou-se 100 μL da solução de DNA em um novo tubo de 1,5 mL e armazenou-se à -20°C.

3.2.3.3 Quantificação e verificação da qualidade do DNA

As amostras de DNA extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop®, em 1 μL de solução de DNA. A relação de absorbância do DNA (260 nm) e de proteínas (280 nm) foi considerada como um dos critérios de avaliação da qualidade do DNA. Considera-se de baixa qualidade o DNA que apresentar índice 260/280 inferior à 1,6, e ótimo quando maior que 1,9 (NanoDrop, 2007). Outro parâmetro analisado foi a quantidade de DNA em ng/ μL de amostra extraída.

Em seguida, a qualidade do DNA foi verificada em gel de eletroforese horizontal com 1,5% de agarose e corada com GelRed™, utilizando-se tampão TBE 1X, por uma hora em 100 V.



Figura 1. Imagens das espécies coletadas no presente estudo, onde: (A) *Bambusa multiplex*; (B) *Bambusa oldhamii*; (C) *Bambusa tuldooides*; (D) *Bambusa vulgaris*; (E) *Dendrocalamus asper*; (F) *Guadua angustifolia*; (G) *Guadua chacoensis*; (H) *Phyllostachys aurea*; (I): *Phyllostachys edulis*. Fonte: Google Images.




Figura 2. Imagens de *Chusquea tenella*, espécie de bambu utilizada para o teste de protocolos de extração de DNA (J) Hábito de crescimento desta espécie; (L) Detalhe das folhas do ramo de *C. tenella*; (M) Ilustração botânica de *C. tenella*. Fonte: Google Images.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Autorização para a coleta de material biológico – Sisbio (Figura 3)

Até a Convenção sobre Diversidade Biológica (tratado da ONU, estabelecido na ECO-92) entrar em vigor, os recursos genéticos eram considerados como patrimônio da humanidade, podendo ser acessados livremente.

Figura 3. Autorização para a coleta de material vegetal – SISBIO.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 45390-1	Data da Emissão: 31/07/2014 16:43
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Márcia Denise Rossarolla	CPF: 002.589.480-02
--------------------------------	---------------------

SISBIO

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, possessor ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidrófitos, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidrófitos para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Ver a maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	FAMÍLIA	Poaceae

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 55982877



Página 1/1

Atualmente, a partir da versão da Medida Provisória de nº 2.186-16 de 23 de agosto de 2001, regulamentada pelo Decreto nº 3.945 de 2001, o acesso e a remessa do patrimônio genético, bem como o acesso ao conhecimento tradicional associado existente no país, passaram a ser de autorização do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN). Conforme a Deliberação nº 40 do CGEN, o mesmo passou a deliberar sobre processos que envolvem acesso ao patrimônio genético para fins de bioprospecção e desenvolvimento tecnológico, acesso ao conhecimento tradicional associado para quaisquer finalidade, e credenciamento de instituição fiel depositária (Azevedo & Silva, 2005).

A Medida Provisória nº 2.186-16 de 2001 conceitua “patrimônio genético” como sendo “a informação de origem genética, contida em amostras do todo ou parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal, na forma de moléculas e substâncias provenientes do metabolismo destes seres vivos e de extratos obtidos destes organismos vivos ou mortos, encontrados em condições *in situ*, inclusive domesticados, ou mantidos em condições *ex situ*, desde que coletados *in situ* no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva” (Brasil, 2001).

Anterior à implementação da Sisbio, as autorizações de coleta de material biológico e a realização de pesquisa em unidades de conservação federais e cavernas eram protocoladas em diferentes unidades do Ibama (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais), o que levava a lentidão operacional, elevados custos e esforços de análise. O Sisbio é um sistema de atendimento à distância que permite a pesquisadores solicitarem autorizações de coleta (ICMBio, 2014a).

O Sisbio é vinculado ao ICMBio, e que, por sua vez, é vinculado ao MMA. Através da autorização da Sisbio, a ICMBio é capaz de realizar a gestão da informação resultante das pesquisas realizadas, por meio do recebimento de atividades que integram a base de dados do Instituto. Estas pesquisas realizadas são feitas visando a conservação da biodiversidade (ICMBio, 2014a).

A integração dos dados gerados pelos pesquisadores será relacionada a uma base cartográfica digital de qualidade, provendo, assim, mecanismos de difusão de informações sobre a biodiversidade nacional para a comunidade

científica, tomadores de decisão, formuladores de políticas ambientais e educadores. O Sisbio é regulamentado pela Instrução Normativa nº 03/2014, que dispõe sobre a coleta de material biológico com finalidade científica e a realização de pesquisa em unidades de conservação federal e será revisada pelo Comitê de Assessoramento Técnico do Sisbio (ICMBio, 2014a).

Os tipos de solicitações disponibilizadas pela Sisbio são: a) Autorização para atividades com finalidade científica; b) Autorização para atividades com finalidade didática (no âmbito do ensino superior); c) Licença permanente, e; d) Registro voluntário para coleta e transporte de material botânico, fúngico e microbiológico. Estas autorizações não podem ter fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos (ICMBio, 2014b).

3.3.2 Coleta de material vegetal

Para as coletas de indivíduos do presente trabalho, foram realizadas expedições direcionadas a campo, a partir de informações disponíveis nas fontes supracitadas. Vale ressaltar a dificuldade de realização destas coletas, pois muitas vezes os indivíduos a serem coletados estão em aclives de morros ou em matas fechadas ou pouco exploradas (Figura 4). As coordenadas geográficas coletados com GPS topográfico foram transformadas em um mapa com as localidades de coleta (Figura 5).

Para a localização das espécies de interesse na Ilha de Santa Catarina, um estudo bibliográfico foi realizado a partir de dados publicados. A principal fonte de informação é o site “*Species Link*” (<http://splink.cria.org.br/>). Este é um banco de dados de informações primárias sobre onde biodiversidade disponível em museus, herbários e coleções microbiológicas. Este site é resultado do Projeto “Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas: a Integração do Species Analyst e do SinBiota (FAPESP), que tem por objetivo a disseminação de informação sobre espécies e espécimes (flora, fauna e microbiota), associado à um sistema de previsão de distribuição geográfica de espécies. Atualmente, conta com a integração de dados de 369 coleções, com mais de 700 mil registros *on-line*.

Em um segundo momento, utilizou-se dos dados de coleta de Greco (2013). Em sua dissertação, intitulada “Diversidade de bambus (Poaceae: Bambusoideae) na ilha de Santa Catarina, Brasil”, foi realizado um levantamento com o objetivo de avaliar a diversidade das tribos presentes neste local, fornecendo meios para identificação de espécies, informações taxonômicas, de conservação e de ocorrência. Foram levantados dados sobre a tribo Olyreae, tribo Bambuseae, com ênfase em táxons nativos da ilha, e sobre bambus exóticos estabelecidos na ilha. O levantamento foi baseado em revisão bibliográfica, revisão de coleções de herbários, coletas e observações a campo, realizadas entre maio de 2011 e março de 2013.

As exsicatas montadas das diferentes espécies coletadas serão, posteriormente, depositadas no herbário FLOR, da Universidade Federal de Santa Catarina. Estas exsicatas servem como uma contraprova para os estudos de diversidade genética e *barcode*, uma vez que pode ser comprovada a espécie utilizada através da identificação correta das exsicatas (Figura 6).

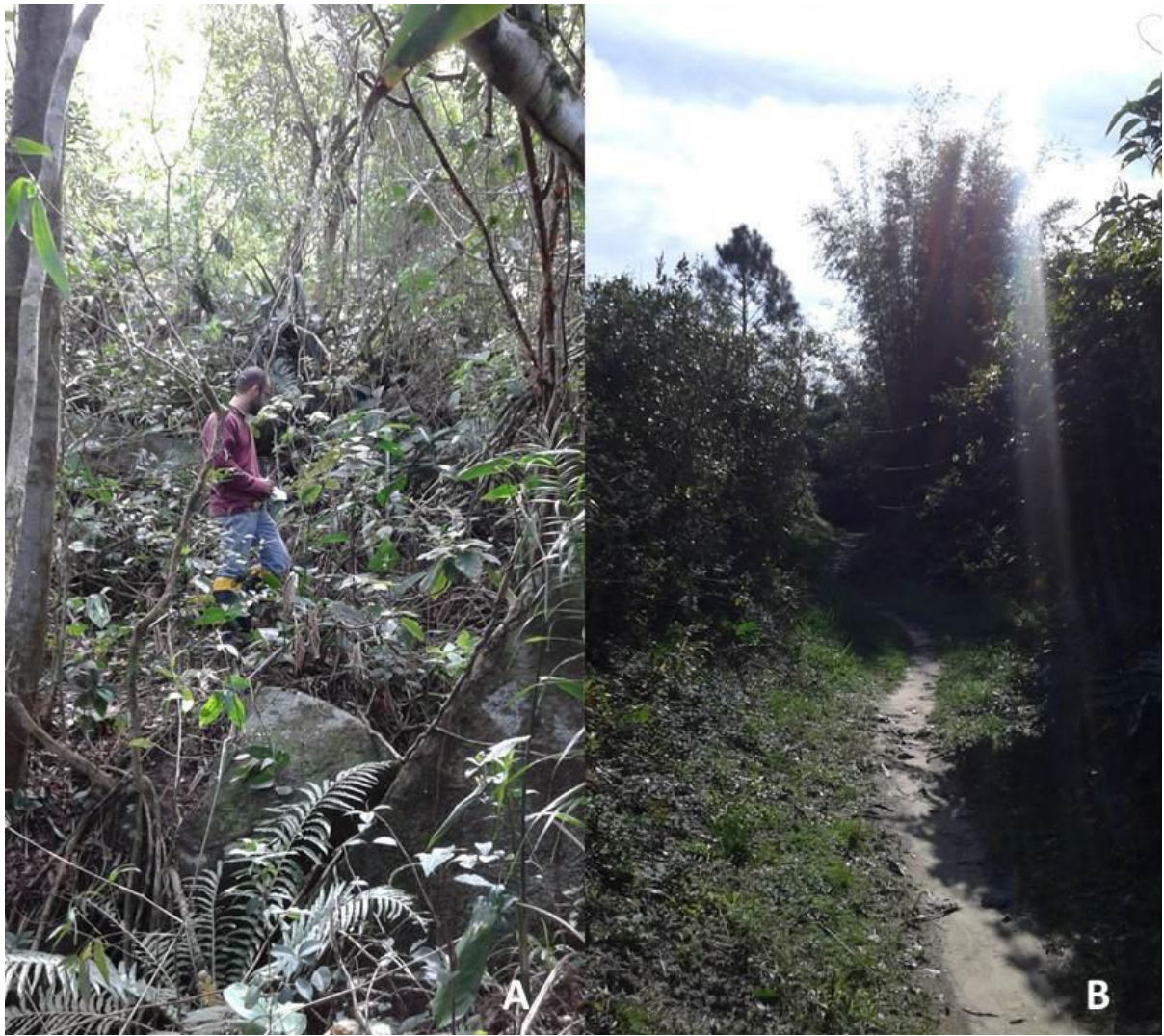


Figura 4. Registros da coleta da localidade “Praia Mole”, onde foi coletada uma população de *Chusquea tenella*; (A) Pontos de coleta no morro da Praia Mole, entre as praias Mole e Galheta; (B) Trilha para a chegada do ponto de subida ao morro.

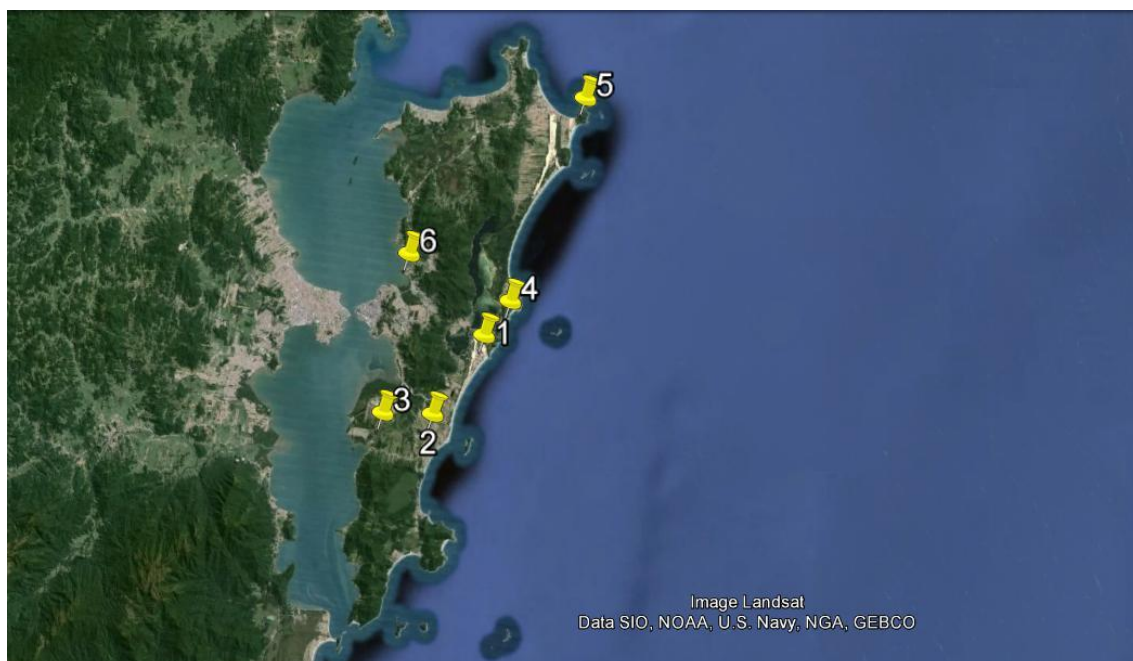


Figura 5: Mapa da ilha de Florianópolis/SC com as localidades de coleta do material vegetal, onde: (1): Parque Dunas da Joaquina; (2): Campeche; (3): Fazenda Experimental Ressacada (UFSC); (4) Praia Mole; (5): Ingleses; (6): João Paulo.



Figura 6. Registros das plantas coletadas para montagem de exsicatas, sendo: (A) *Bambusa vulgaris*; (B): *Chusquea tenella*; (C) *Merostachys scandens*; (D): *Colanthea intermedia*.

3.3.3 Teste de protocolo de extração de DNA pra *Chusquea tenella*.

Os resultados de quantidade de DNA e índice 260/280 obtidos através de espectrofotômetro Nanodrop® estão descritos na tabela 3. Os resultados de quantidade de DNA na solução (ng/μL) se apresentam bastante elevados, uma vez que não foi feita uma diluição prévia das amostras para a leitura em espectrofotômetro.

Fazendo uma simples comparação entre médias, pode-se notar que o método CTAB apresentou-se mais eficiente em relação à quantidade de DNA extraído (848,05 ng/μL), em comparação ao kit comercial de extração (285,5 ng/μL). No entanto, o índice 260/280 mostrou-se inferior para o método CTAB, sugerindo que o DNA extraído apresenta menor qualidade em relação ao DNA extraído pelo kit comercial. O índice 260/280 é um indicador de contaminação por proteínas, assim, amostras cujos valores são inferiores a 1,8 são consideradas contaminadas.

Tabela 3. Dados obtidos na leitura em espectrofotômetro Nanodrop® de 1μL de solução de DNA extraída.

	KIT					CTAB				
	1	2	3	4	Média	1	2	3	4	Média
ng/μL	146,1	389,1	359,1	247,8	285, 5	412,1	1140,3	1039,9	808,9	848,05
260/280	1,82	1,81	1,83	1,83	1,82	1,62	1,83	1,82	1,79	1,76

O gel de agarose em eletroforese permite quantificar o DNA e analisar quanto a sua qualidade. A figura 7 representa o gel de agarose 1,5% com as amostras de DNA extraídas submetidas à eletroforese 100 V.

Pode-se observar que o DNA extraído pelo método CTAB apresentou mais degradado em relação ao kit comercial, confirmando os dados anteriores do índice 260/280. Isto é evidenciado pela análise da zona A da figura 7, que representa a zona de concentração de DNA íntegro. As amostras cujo DNA foi extraído com o kit comercial apresentaram DNA mais íntegro, ou seja, menos degradado. Assim, pode-se concluir que, mesmo com uma menor média de DNA extraído, a qualidade deste é maior. Resultados semelhantes foram observados por Feres *et al.* (2005), onde a extração de DNA de *Kielmeyra*

lathrophyton Mart & Zucc. (família Clusiaceae) pelo método CTAB foi ineficaz, e somente foi observado DNA no gel por extração pelo kit comercial.

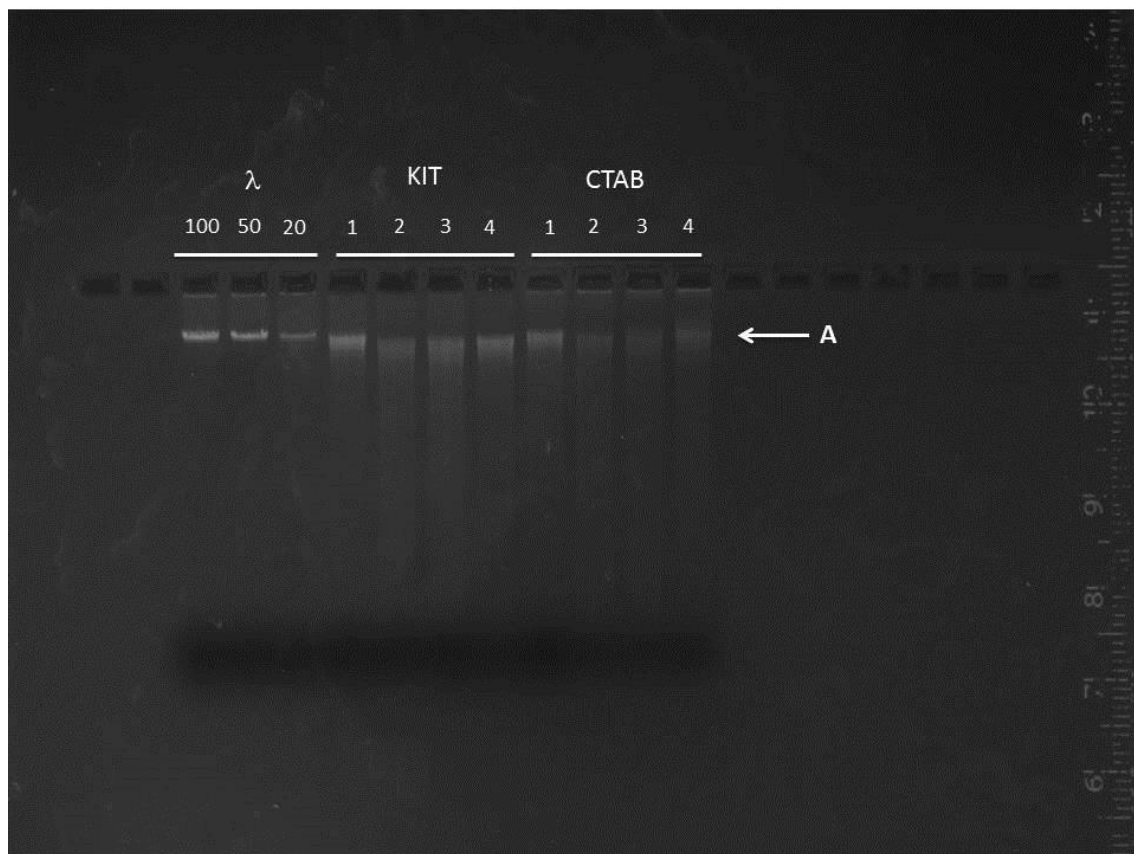


Figura 7. Gel de agarose 1,5% das amostras extraídas de *Chusquea tenella* para a comparação entre dois métodos de extração de DNA genômico total, método CTAB 2% com modificações e kit comercial; onde (A): zona de concentração de DNA íntegro.

O objetivo de qualquer protocolo de extração é obtenção de DNA de alta qualidade, em quantidade, de forma rápida e eficiente. Os protocolos devem evitar a degradação do DNA pela atividade de DNases, eliminar os polissacarídeos, que inibem a ação de enzimas, e as substâncias fenólicas ou outros compostos secundários, que podem danificar o DNA. (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A presença de polissacarídeos na solução de DNA pode inibir o uso de técnicas como a reação em cadeia de polimerase (PCR). O brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB) é um detergente útil para o isolamento de DNA de tecidos que contém elevadas quantidades de polissacarídeos. Este componente solubiliza as membranas celulares e, dependendo da quantidade de sais (NaCl) no tampão, forma um complexo com o DNA, podendo, portanto,

ser utilizado para precipitá-lo seletivamente nos casos de difícil separação, como folhas maduras (Kidwell & Osborn, 1992).

O material extraído estava sob congelamento a -20°C por aproximadamente de 15 dias, o que pode ter influenciado nos resultados. Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), o isolamento de DNA é afetado significativamente pelas condições do tecido antes da extração. Por isso, recomenda-se utilizar material mais fresco possível.

O passo chave para análise de diversidade genética de populações de plantas, através de fragmentos de DNA, é o isolamento e a purificação de quantidades suficientes e de boa qualidade, ou seja, o DNA obtido deve estar íntegro de livre de impurezas, e ser passível de amplificação. Modificações nos métodos básicos, pela adição de antioxidantes, agentes desproteinizantes e outros, podem melhorar a eficiência ou mesmo possibilitar a obtenção de DNA, principalmente em espécies com elevada concentração de metabolitos secundários (Milach, 1998). Assim, novos testes ainda devem ser realizados com o objetivo de atingir uma maior pureza e qualidade no DNA para os posteriores estudos de diversidade genética e *barcode* das espécies de bambu em estudo.

3.4 Conclusões e perspectivas

- Obteve-se sucesso nas expedições, sendo coletadas espécies-alvo do presente trabalho;
- Foram realizadas coletas de material vegetal de espécies-alvo do projeto em questão com a finalidade de um futuro estudo de diversidade genética de populações na região da ilha de Santa Catarina, e de *barcode* destas espécies;
- Sugere-se a continuação das expedições de coleta para que se possa atingir a totalidade de populações mínimas para os estudos de diversidade genética de população;
- Em relação aos protocolos de extração, estes permitiram a efetiva extração do DNA de *Chusquea tenella*.

- A extração de DNA genômico através do kit comercial de extração NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel) mostrou-se mais eficiente em relação à qualidade do DNA extraído, porém em menor quantidade que o protocolo CTAB 2%;
- Sugerem-se novos testes com mudança nos componentes do protocolo de extração CTAB 2% para a obtenção de DNA íntegro e purificado;

4. Considerações Finais

Neste estágio de conclusão de curso, no processo de desenvolvimento deste projeto com bambu, tive a oportunidade de trabalhar com espécies, aprender novas técnicas laboratoriais e de campo, que não tinha trabalhado anteriormente durante a graduação. São técnicas importantes que permitirão o desenvolvimento de habilidades voltadas para futuros possíveis trabalhos científicos.

Ademais, tive a oportunidade de conhecer belos lugares da ilha de Santa Catarina, bem como, realizar atividades relacionadas ao programa de pós-graduação com a convivência de outros pós-graduandos que trabalham com outras espécies vegetais e estudam padrões de desenvolvimento e fotossíntese.

5. Referências

- AZEVEDO, M.C. do A.; SILVA, F.A. da (2005) Regras para o Acesso Legal ao Patrimônio Genético e Conhecimento **Tradicional Associado**. **Ministério do Meio Ambiente** – Departamento do Patrimônio Genético. Brasília – DF.
- BARBOSA, A.C. (2012) Bioengenharia utilizando bambus em faixas para o controle de processos erosivos: uma análise qualitativa. **Polibotânica**, 33: 223-243.
- BONILLA, O.H. (1991) **Análises quantitativas de produção de *Bambusa vulgaris* Scharder ex Wendland for. *vulgaris* no Estado da Paraíba**, 95f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- BPG (Bamboo Phylogeny Group) (2012) An updated tribal and subtribal classification of the bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society**, 24(1): 1-10.
- BRASIL (2001) Medida Provisória nº 2.186-16 de 23 de agosto de 2013, Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição, os arts. 1º, 8º, alínea "j", 10, alínea "c", 15 e 16, alíneas 3 e 4 da Convenção sobre Diversidade Biológica, dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 24 Ago. 2001. Disponível em https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/mpv/2186-16.htm, Acesso em 10 Nov. 2014.
- BYTRIAKOVA, N.; KAPOV, V.; LYSENKO, I. (2003) **Bamboo Biodiversity: Africa Madagascar and the Americas**. UNEP – WCMC/INBAR. Disponível em: http://www.unep-wcmw.org/resources/publications/UNEP_WCMC_bioseries/19.htm, Acesso em: 23 out. 2014.

CHAPMAN, G.P. (1990) **Reproductive versatility in the grasses**. Cambridge Press, 310p.

CORREAL, J.F.; ARBELÁEZ, J. (2010) Influence of age and height position on colombian *Guadua angustifolia* bamboo mechanical properties. **Ciencia y tecnologia**, 12(2): 105-113.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19: 11-15.

FALEIRO, A.S.G.; SANTOS, M.C.M. (2004) Variability in cacao accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.4, p.227-233.

FALEIRO, F.G. (2007) **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Embrapa/Cerrados, Planaltina, 102p.

FERES, F.; SOUZA, A.P. de; AMARAL, M.C.E. do; BITTRICH, V. (2005) Avaliação de métodos de preservação de amostras de plantas de savanas neotropicais para a obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. **Revista Brasileira de Botânica**, 28(2): 277-283.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. (1995) **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, DF: Embrapa Cenargen, 220p. (Embrapa-Cenargen, Documentos, 20).

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. (1998) **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 220p.

FILGUEIRAS, T.S.; SANTOS-GONÇALVES, A.P.S. (2011) **Bambus nativos no Brasil: oportunidades e desafios para seu conhecimento**. Anais: I Seminário Nacional do Bambu, 2ed, Brasília: CPAB, Universidade de Brasília, 196p.

FILGUEIRAS, T.S.; LONGHI-WAGNER, H.M.; VIANA, P.L.; ZANIN, A.; OLIVEIRA, R.C. de; CANTO-DOROW, T.S.; SHIRASUNA, R.T.; VALLS, J.F.M.; OLIVEIRA, R.P.; RODRIGUES, R.S.; SANTOS-GONÇALVES, A.P.S.; WELKER, C.A.D. (2013) **Poaceae**. In.: Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB102232>, Acesso em: 03 nov. 2014.

FRIAR, E.; KOCHERT, G. (1991) Bamboo germplasm screening with nuclear Restriction Fragment Length Polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, 82: 697-703.

GRECO, T.M. (2013) **Diversidade de bambus (Poaceae: Bambusoideae) na Ilha de Santa Catarina, Brasil**. 151p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal) – Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

GUPTA, P.K.; BALYAN, H.S.; SHARMA, P.C.; RAMESH, B. (1996) Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. **Current Science**, 70(1): 45-54.

HORN FILHO, N.O. (2004) Estudos morfosedimentares (1970-2004) nas praias da ilha de Santa Catarina, SC, Brasil, uma síntese. **Gravel**, 2(1): 57-70.

ICMBio – **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade** (2014a). Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/sisbio/saiba-mais.html>. Acesso em 07 de novembro de 2014.

ICMBio – **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade** (2014b). Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/sisbio/>. Acesso em 07 de novembro de 2014.

JANZEN, D.H. (1976) Why bamboos wait so long to flower. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 7: 347-391.

JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK, L.G.; LONDOÑO, X.; STERN, M.J. (1999) **American Bamboos**. Washington, Smithsonian Institution Press.

JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK, L.G. (2007) Classification and biogeography of new world grasses: Anomochloideae, Pharoideae, Ehrhartoideae and Bambusoideae. **Aliso**, 23: 303-314.

KIDWELL, K.K.; OSBORN, T.C. Simple plant DNA isolation procedures. In: BECKMANN, J.S.; OSBORN, T.C. **Plant genomes: methods for genetic and physical mapping**. London: Kluwer Academic Publ., 1992. p.1-13.

LONDOÑO, X. (2001) **Evaluation of bamboo resources in Latin America**. INBAR, 30p.

MILLACH, S.C.K. (1998) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Millach, 141p.

MIR, R.R.; HIREMATH, P.J. RIERA-LIZARARN, O.; VARSHNEY, R. (2013) **Evolving molecular marker technologies in plants: From RFLPs to GBS**. In: Lubbersteott, T.; Varshney, R. (eds.). **Diagnostic in plant breeding**, Springer Verlag, Germany, p. 229-247.

MORIS, S.A.; BOOM, B.; CARVALHO, A.M.; SANTOS, T.S. (1983) Southern Bahian moist forest. **Botanical Review**, 49: 155-232.

NANODROP TECHNOLOGIES (2007) **INC.ND-1000 Spectrophotometer v3.5 User's Manual**. Wimington, USA, 61p.

NEGI, D.; SAXENA, S. (2011) *In vitro* propagation of *Bambusa nutans* Wall. ex Munro through axillary shoot proliferation. **Plant Biotechnology**, 5: 35-43.

NIRMALA, C; BISHT, M.S.; PREMLATA, T. (2012) Germplas evaluation in bamboos: From chromosomes to molecular markers. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, 13(3&4): 99-104.

RAMANAYAKE, S.M.S.D.; MEEMADUMA, V.N.; WEERAWARDENE, T.E. (2007) Genetic diversity and relationships between nine species of bamboo in Sri Lanka, using Random Amplified Polymorphic DNA. **Plant Systematic and Evolution**, 269: 55-61.

SALLES, G.; BUSSO, C.; YAMAGUICHI, A.; MORETZAORN, M. de C.; AMARAL, Z.P. de S. (2003) **Circular Técnica 20**: Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites, Embrapa, Brasília-DF.

SHARMA, P.; SARMA, K.P. (2011) *In vitro* propagation of *Bambusa balcooa* for a better environment. **International Conference on Advances in Biotechnology and Pharmaceutical Sciences**.

SILVA, R.M.C. (2005) **O bamboo no Brasil e no mundo**. Disponível em: http://www.embambu.com.br/imagens/bambu_brasil_mundo_pdf, Acesso em: 20 out. 2014.

SINGH, S.R.; SINGH, R.; KALIA, S.; DALAL, S.; DHAWAN, A.K.; KALIA, R.K. (2013) Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo – a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology Plants**, 19(1): 21-41.

SODERSTROM, T.R.; CALDERON, C.E. (1974) Primitive forest grasses and evolution of the Bambusoideae. **Biotropica**, 6: 141-153.

SODERSTROM, T.R.; YOUNG, S.M. (2003) A Guide to Collecting Bamboos. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 70(1): 128-136.

SUNGKAEW, S.; STAPLETON, C.M.A.; SALAMIN, N.; HODKINSON, T.R. (2009) Nonmonophyly of the woody bamboos (Bambuseae; Poaceae): A multigene region phylogenetic analysis of Bambusoideae s.s. **Journal of Plant Research**, 122: 95-108.

TRIPLETT, J.K.; CLARK, L.G. (2010) Phylogeny of the temperate bamboos (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae) with an emphasis on *Arundinaria* and allies. **Systematic Botany**, 35(1): 102-120.

TRIPLETT, J.K.; OLTROGGE, K.A.; CLARK, L.G. (2010) Phylogenetic Relationships and Natural Hybridization Among the North American Woody Bamboos (Poaceae: Bambusoideae: Arundinaria), **American Journal of Botany**, 97(3) : 471-492.

WATSON, L.; DALLWITS, M.J. (1992) **Grass genera of the world:** Descriptions, illustrations, identification and information retrieval; Including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution and references. Disponível em: <http://biodiversity.uno.edu/delta/>, Acesso em: 20 out. 2014.

WU, N.C.Y. (1962) Classification of Bambuseae on leaf anatomy. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, 3: 83-107.

ZHANG, W.; CLARK, L.G. (2000) Phylogeny and classification of the bamboo (Poaceae: Bambusoideae) In.: Jacobs, S.W.L.; Everett, J. (eds.). **Grasses Systematics and Evolution** (Proceedings of the 2nd International Conference on the Comparative Biology of the Monocotyledons). Melbourne: CSIRO, 2: 35-42.